

百聞は一見に如かず—神経現象の可視化



研究ノート

小倉明彦*

Seeing is believing—Visualization of Neural Phenomena

Key Words : Fluorescence imaging, Intracellular calcium, Neural transmission

「頭の中で記憶はどのようにして作られるのか」、という不思議に魅せられて神経研究に入ってから、もう20年以上が経ってしまった。こうした大問題にそうそう簡単に解答が出るはずもないが、それでも20年前に比べればこの分野の理解はすいぶん進んだ。その中で私自身がとってきた戦略を織りまぜながら、記憶機構研究の現状を紹介してみよう。

1. 目で見て納得する

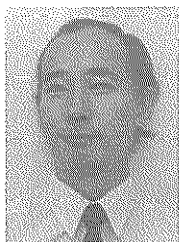
私の学位研究は、単細胞生物(ゾウリムシ)の細胞膜の興奮現象を、細胞内に挿入した電極を通じて測定することだった。ゾウリムシは、興奮すると体表の繊毛を逆方向に打って後向きに泳ぐという、目に見える応答をしてくれてわかりやすい。ところが、就職して念願の高等動物の脳に取り組んでみると、神経細胞は興奮しても(興奮機構はゾウリムシと全く同じ)動きもしなければ光りもしない。ただオシロスコープ上に電位変化が記録されるだけで、全く張り合いがない。何とかして神経興奮を可視化した。そうすれば、一つの細胞の興奮が他の細胞に伝播して、情報が処理されつつ広がって行く様子がわかる。

そんな漠然たる願いを持っていた1982年、R. Y. Tsienの論文¹⁾が、目を引いた。それは細胞内の遊離カルシウムイオン濃度(以下 $[Ca^{2+}]_i$ と略す)の濃

度を蛍光強度比で示す指示薬についての報告で、その指示薬(quin2)にはもう一つの工夫があった。カルボキシル基をすべてエステル化し、脂溶性にして細胞に投与すると、細胞に備わった非特異的エステル分解酵素によって分解され、自動的に細胞内に入るのだった。Tsienは、quin2を白血球の懸濁液に取り込ませて分光光度計で計測していたが、私と私のボス(工藤佳久博士、現東京薬科大学生命科学部長)のひらめきは、これを顕微鏡ビデオと組み合わせれば、個々の神経細胞の興奮に伴う $[Ca^{2+}]_i$ の変動を目で見られるはず、ということだった。

その日から私たちは顕微鏡の改造にとりかかった。精密機械である顕微鏡には、レンズやプリズムなど、ここを触って壊したらメーカーは責任を負わないという不可触部分がたくさんある。しかし、紫外線領域で励起する必要のあるquin2には、紫外線透過率の低いガラス素材でできたレンズを使っているのは像ができない。目をつぶりハンマーを振ってそれらをぶち破き、特注で作らせた石英製のそれらで置き換える。「何々収差補正用の何々」だとかは、多少像が歪もうがひずもうが見えなくてはすべてが始まらない、と割り切って全部取り除く。光源のコンデンサーレンズは、集光度が悪くてもミラーに代え、そのぶん光源のワット数を上げて取り戻す。300Wのキセノンアーク灯は、数時間点灯すると実験室の空気をオゾンたっぷりの高原のそれに変えてくれる。励起光を作るフィルターは、建前上はその波長以外の光を反射することになっているが、わずかな吸収分を蓄積して燃えんばかりに熱くなり、数週間使用すると突然ビシッと音を立てて割れる。それでも、当時の顕微鏡用テレビカメラ(ビジコン級)は感度が低く、肉眼では何とか見えている像なのに、それを映し出すことができない。「もっと光を、もっと感度を」と研究所長に資金を直訴し、「金食い虫」と

* Akihiko OGURA
1951年7月3日生
1977年東京大学大学院理学系研究科修士課程修了
現在、大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻、教授、理学博士、神経生物学
TEL 06-6850-5426
FAX 06-6850-5441
E-Mail oguraa@bio.sci.osaka-u.ac.jp



の周囲の白い目が気になり出した1年半後、3台目のカメラ(シリコン増強撮像管カメラ、いわゆるスパイ衛星カメラ)が、なんとか像を結んでくれた。今から考えると笑い話だが、そこまでの資金の尽きた私たちは、結んだ像を画像解析することができなかった。そこでモニターブラウン管の表面にガラスファイバーを垂直に立て、もう一方の端にホトダイオードを取りつけて、出力をペンレコーダーで描記した。討ち死に寸前の、まさに薄氷を踏む完成である。

折しもTsienがquin2より蛍光効率が一桁高い新色素fura-2を発表し、これを使って光源を150Wに落とした実用的な装置ができあがった。こうして発表した論文²⁾は、世界初の顕微Ca²⁺定量法の報告となった。自慢するのは大人気ないが、現在世界中の細胞生物学の研究室に、ごく日常の研究機器の一つとして備わっている装置は、これを原型としたものである。そのとき特許をとっておけば、今ごろ悠悠自適だったのに、と残念でもあるし、あまりに普及したこの頃は、学会などで専門を聞かれて「Ca²⁺の顕微定量を少々」などと答えると、「ああ、先生もですか」と後追い扱いされて多少不満でもある。そういう時は、手塚治虫さんが取材に来られて「ネオファウスト」の一コマ³⁾になった私たちの初代装置を見て「知る人ぞ知る」と自分を慰めるのだが。

2. 記憶機構解析へのアプローチ

培養神経細胞をこの顕微鏡でのぞいてすぐに気づいたのは、視野いっぱいの細胞がクリスマスのイルミネーションのように明滅していることだった⁴⁾。蛍光強度がピークツーボトムで2倍くらい変動するから肉眼でもわかる。シャーレ内で神経細胞が情報をやりとりしているのが目に見える!

さて、哺乳類の海馬(大脳皮質の一部分)では、入力神経線維を一度強く刺激すると、それ以降長く信号伝達効率が上昇したままになる「長期増強」という現象が知られている(図1)。これは記憶の解析モデル現象として広く使われていた。私たちは、山形大学医学部の加藤宏司教授らと協同して、それまで一つの仮説として行われていた「長期増強の成立には[Ca²⁺]_iの上昇が引き金になる」を検証しようと、完成したての装置を適用した。私たちが長期増強誘発刺激を行うと、はたして大きな[Ca²⁺]_i上昇の起こるのが見られた。また、薬剤で[Ca²⁺]_i上昇を抑

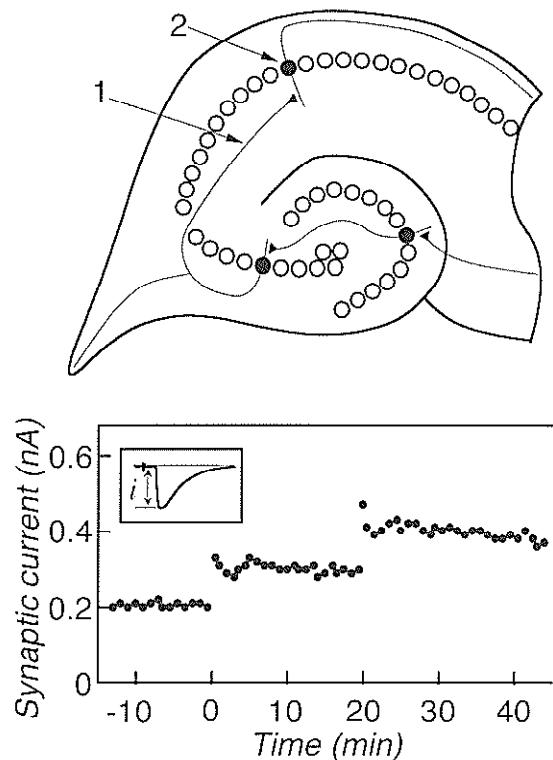


図1 海馬の長期増強現象. 上は海馬横断面の模式図. 丸印の位置に神経細胞がぎっしり並んでいる. 黒丸の細胞は海馬内の神経連絡を代表的に示したものである. 矢印1に刺激用の電極を置き、矢印2に記録用の電極を置く. 下は実験結果. 0.1Hz程度の低頻度でテスト刺激を行うと、挿図のような一定の大きさの反応がえられるが、0分と20分の時点で強い(=100Hz程度の高頻度の)刺激を与えると、その後の低頻度テスト刺激に対しても反応が増した状態が続く. つまり、高頻度入力後に伝達効率が履歴的に高まる。

えると、その程度に見合って長期増強の成立も抑えられた。こうしてCa²⁺仮説は実証されたのである⁵⁾。

Ca²⁺の細胞内流入をもたらす分子は「NMDA型グルタミン酸受容体(NR)」とよばれる蛋白質である。画像で見ると、この分子が細胞上のどこにあるかがわかる。これは電極で電位を記録したのでは得られない情報である。流入したCa²⁺が細胞の中をそう遠くまで移動しないことも一目瞭然に見て取れた。となると、Ca²⁺はNRのそばにある分子を活性化するはずで、遠方の(たとえば細胞核周辺の)分子を活性化するはずがないことが推測できる。現在ではそれがII型Ca²⁺/カルモジュリン依存性蛋白質リニン酸化酵素(CaMKII)であることがわかっている。実際、MITの利根川進博士らがNRやCaMKIIの欠失マウスを作ったところ、著しい記憶障害が見られたという。

Ca²⁺画像法で明らかになったことのもう一つは、長期増強誘発刺激によって起こる[Ca²⁺]_i上昇は3分程度で刺激前の水準に戻ってしまうことだった。しかし、伝達効率の増強状態は3分どころか、あえて解除刺激を行わないかぎりずっと続く。私たちと名古屋市立大学医学部の鈴木龍雄博士とは、Ca²⁺によって活性の増したCaMKIIが自分をリン酸化してCa²⁺非依存型に転換するのだろうと考えて、未リン酸化CaMKIIとリン酸化CaMKIIとを識別する抗体を作り⁶⁾、予測を目に見える形で証明することができた。これで3分の現象が数時間まで延長される理由がわかったが、問題はさらにその後である。

3. 長期記憶に挑む

記憶には、蛋白質の合成を伴わない早い相と、合成を必要とする遅い相とがある。大変紛らわしいのだが、先述の海馬の「長期増強」はこの短期記憶の典型例である。記憶が数時間を超えて数日～一生持続するものになるには、蛋白質が新合成されて細胞の形が変わり、新しい結合が作られる過程があるとされる。その証拠に蛋白合成阻害剤の投与は長期記憶の形成を妨げる。しかし長期記憶には、短期記憶における海馬「長期増強」のような解析に好都合な現象が知られていないため、(心理学や動物行動レベルでの研究は古くからあるが)細胞レベルでの解析には手をつけられていなかった。折しも阪大に移籍して自分の研究チームをもてることになった私は、これに挑戦しようと思った。もちろんここでも自分の主義、「そう解釈できる」ではなくあくまで実際に目で見ると、を貫きたい。

材料には、培養脳切片という標本に着目した。生後間もなくの若いラットの脳を0.3mm程度の薄切片にし、酸素を供給しながら2～4週間培養すると、神経回路は維持されつつほとんど単層になる。培養だから長期記憶随伴現象の解析にじゅうぶんな時間がとれるし、薄層だから形態観察も薬剤の適用も容易である。この方法の第一人者として知られる東海大学医学部の富永恵子博士を呼び倒してチームに加わってもらった。富永博士はウィルスベクターを使って培養切片の神経細胞に蛍光蛋白質を作らせることに成功し(図2)、現在くり返し電気刺激や薬物刺激を与えたあと、数日から数週間にわたって神経の出力繊維(軸索)が伸びて新しい神経結合が作られる様子を映画に撮影しようと、奮闘してくれている。世

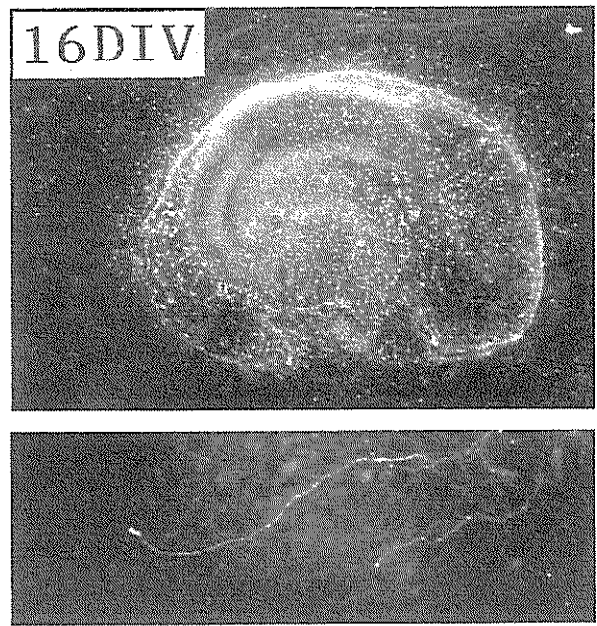


図2 ラット海馬の培養切片. 上は生後8日仔から調製して16日後の標本全体像. 下はその蛍光像. 緑色蛍光蛋白質の遺伝子を取り込ませ、1個の神経細胞の出力繊維の成長端を拡大観察している。

界的には、神経の入力構造(樹状突起棘)の形態変化が、二光子励起蛍光顕微鏡法(通常の励起波長の倍波長の励起レーザー光を光子2個ぶん吸収させて蛍光画像を得る方法; 超高価で調整も微妙という難点はあるが、退色が少ない、標本に与える損傷が少ない、標本の深部まで観察できるなどの利点がある)という新しい技術を用いて解析され始めているが、長期記憶の成立には、出力側・入力側両者の変化が必要なはずだ(図3)。

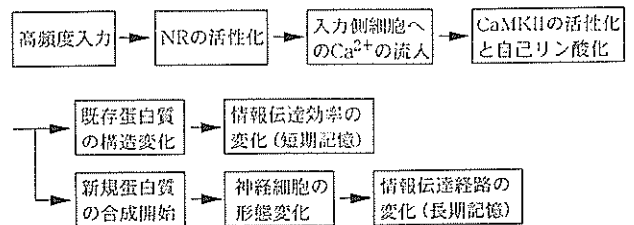


図3 現在考えられている記憶成立までのあらすじ(略称は本文参照)。

4. あくまで「見る」にこだわる意義

細胞の膜電位変化は、ゾウリムシのように細胞自身が運動に変換してくれるか、実験者が[Ca²⁺]_iの

変化に置き換えるかしないと直接見るのは難しい。電気活動が $[Ca^{2+}]_i$ 変動を伴わなければ、やはり電極(生理食塩水を詰めたガラス微小管など)のお世話になるのが通常だ。しかしここに電位感受性色素というものがある。脂溶性かつ電気双極的な色素で、細胞膜内外の電位差にしたがって膜内で配向を変え、それをモル吸光率の変化として蛍光強度に変換してくれる(正確な機作は未解明)。電位感受性色素の蛍光変化はごく微小(0.1%程度)なのでノイズとの勝負になり、膜成分がじゅうぶん多い標本でないと実用にならないが、幸い培養切片標本には辛うじて使えそうだ。

記憶は神経結合の伝達効率の履歴的变化である。培養脳切片中のある神経細胞の活動がどのように広がるかを見、特定の刺激を加えた後でその広がり方が変化するのが見られれば、記憶をシャーレ中に再現したといえる。もちろん培養脳には手もなければ口もないから、その記憶を行動や言葉にして表わすことはないが、原理の上では同じである。この種の実験には電極は都合が悪い。電極では、活動の伝導や広がり方の変化がどこでどの方向に起こるか予測しておかなくてはならないが、それは難しい。たくさん置いておけばよからうが、一度に扱える電極の数は数本が精一杯である。その困難を補ってくれるのが、空間網羅的に伝達を可視化してくれる上述の電位感受性色素である。幸い基礎工学研究科との研究科共同研究経費をいただくことができ、このための「微弱蛍光変化高速検出装置」が導入できた。「海馬長期増強」のような短期記憶現象については、すでにこの方法での少なからぬ数の解析例があるが、私たちのねらうのはもっと長期の変化である。当面

の戦術は、一つの標本で回路を観測したあと培養に戻し、時期を隔てて再度観測するという手続きになるが(理想的には一つの標本をステージ上に置いたまま、数日にわたる回路の変化を微速度撮影で追跡したい)、培養の継続に必要な完全無菌測定技術や色素の毒性回避など、解決すべき問題はまだまだたくさんあって、計画即実現とはいかない。

このように、「見る」ことには、冒頭に述べた「わかりやすさ=説得力」のほかに、空間網羅性という特長がある。予想外の時期に予想外の場所で起こっている事象を発見するのは、これによるところが大きい。望むらくは、これに実時間性が加わると威力は倍加する。写真を現像したり放射能をカウントしたりして、あとから「あの時そうだった」と判明するのではなく、目下起きていることが知れば、その場の判断でそれを乱したり、追加処置を施して事象の性質を解析することができる。

「見る」生物学にこだわって18年、こだわりはまだまだ続く。

文 献

- 1) R. Y. Tsien et al., *Nature*, 295, 68 (1982).
- 2) Y. Kudo and A. Ogura, *Br. J. Pharmacol.*, 89, 191 (1986).
- 3) 手塚治虫, ネオファウスト, 手塚治虫漫画全集(講談社版), 369, 86 (1995).
- 4) A. Ogura et al., *Neurosci. Lett.*, 78, 69 (1987).
- 5) Y. Kudo et al., *Brain Res.*, 407, 168 (1987).
- 6) T. Suzuki et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 109 (1992).

